EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS SAUERSTOFFOPTIMUM DER CHOLERAVIBRIONEN.

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER

MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT

ZU

FREIBURG IM BREISGAU

VORGELEGT VON

HERMANN GROSS

MEDIZINALPRAKTIKANT

AUS

CÖLN a. Rh.

Druck- und Verlags-Gesellschaft vorm. Dölter, Emmendingen
1910.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Freiburg i. Br.

Dekan: Referent:

Prof. Dr. de la Camp. Geh. Hofrat Prof. Dr. Schottelius.

Meinen lieben Eltern!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543126_0109

Einleitung.

Die Ansprüche der einzelnen Bakterienarten an die äusseren Lebensbedingungen sind sehr verschieden. Die chemische Zusammensetzung des Nährsubstrates, die Temperatur, die Anwesenheit oder das Fehlen bestimmter Gase etc. spielen hierbei eine wichtige Rolle. Schon sehr geringe Änderungen in diesen Faktoren können genügen, um das Fortleben empfindlicher Spaltpilze unmöglich zu machen.

Viele Bakterien zeichnen sich indessen durch eine mehr oder weniger grosse Anpassungsfähigkeit aus. Ebenso, wie die Spaltpilze sich in der freien Natur unter den verschiedenartigsten Existenzbedingungen lebens- und vermehrungsfähig erhalten können, gelingt es auch bei der künstlichen Kultivierung, Bakterien unter für sie ungünstigen Bedingungen weiterzuzüchten. Es sei hier nur daran erinnert, dass Spaltpilze, die wir auf unseren gewöhnlichen Nährböden zu züchten gewohnt sind, auch in ganz einfach zusammengesetzten Nährmedien gedeihen können: z. B. wachsen Bacillus subtilis und mycoides, Bacterium acidi lactici, pneumoniae, mallei, vulgare sowie sämtliche Vibrionen vorzüglich in einer Lösung, die keine anderen Bestandteile enthält als 5,0 g Kochsalz, 2,0 g neutrales Natriumphosphat, 6,0 g milchsaures Ammoniak und 4,0 g Asparagin in einem Liter Wasser.

Ferner ist bekannt, dass die grosse Mehrzahl der in der Regel von uns aerob gezüchteten Spaltpilze — darunter fast alle pathogenen — eine Beschränkung der Sauer-

stoffzufuhr ertragen können, ohne dadurch geschädigt zu werden. Entspricht ja doch das Leben im Tierkörper vielerorts, z. B. im Darmkanal, entschieden einer Existenz bei vermindertem oder fehlendem Sauerstoffzutritt. Umgekehrt hat die neuere Forschung ergeben, dass auch von den scheinbar obligat anaeroben Arten aerobe Rassen vorhanden sind. Ja, es gelingt, durch fortgesetzte Züchtung ursprünglich anaerobe Bakterien an das aerobe Wachstum vollständig anzupassen. Ein jedem Bakteriologen bekanntes Beispiel dieser Art ist das v. Esmarch'sche Spirillum rubrum, das anfangs nur anaerob wuchs, jetzt aber nach der fortgesetzten Kultur in den bakteriologischen Sammlungen gut aerob gedeiht.

Die Anpassungsfähigkeit der Spaltpilze ist jedoch keine absolute. Es gibt stets eine Anzahl von Mikroorganismen, deren Existenzfähigkeit an ziemlich eng begrenzte Lebensbedingungen geknüpft ist. Aber auch Bakterien, die an ihre äussere Umgebung keine so hohen Ansprüche stellen, ertragen erschwerte Existenzbedingungen nur unter Verlust gewisser Leistungsfähigkeiten.

Ein schön demonstrables Phänomen in dieser Beziehung ist die Farbstoffbildung gewisser Bakterien. Alle möglichen Einwirkungen, die das Gedeihen der Spaltpilze ungünstig beeinflussen, vermindern auch die chromogene Funktion. Das Temperaturoptimum für das Bacterium prodigiosum liegt bei 22°—25° C. Es gelingt, den Prodigiosus auch bei Brutschranktemperatur zu kultivieren, wobei aber die Fähigkeit der Farbstoffbildung verloren geht (Schottelius)[1]).

Ebenso wie die Farbstoffproduktion werden auch andere Leistungen der Mikroorganismen durch die Wahl ungünstiger Lebensbedingungen geschädigt. Am folgenschwersten ist hier natürlich die — im Interesse der Erhaltung der Art — wichtigste Leistung, die Vermehrungs-

[1]) Schottelius, Biologische Studien über den Prodigiosus, Leipzig 1887.

fähigkeit. In der Tat beobachten wir bei vielen Bakterien, dass sie sich zwar an veränderte Existenzverhältnisse anzupassen vermögen, dabei aber ihre Wachstums- und Fortpflanzungsfähigkeit zum Teil einbüssen.

Diese Tatsache ist in praktisch=bakteriologischer Hinsicht sehr bedeutungsvoll: wo es darauf ankommt, die Vermehrung der Bakterien möglichst zu begünstigen, müssen wir danach trachten, der betreffenden Spaltpilzart die optimalen Lebensbedingungen zu verschaffen. Solche Anforderungen treten an den Bakteriologen heran, wenn es sich beispielsweise um eine möglichst schnelle Diagnosenstellung handelt.

Seit jeher ist man daher bestrebt, bei der Züchtung der spezifischen Erreger aus den Krankheitsprodukten mit Rücksicht auf den zu erwartenden Befund optimale, womöglich elektiv optimale Lebensbedingungen zu schaffen.

Für einzelne Bakterienarten, z. B. Diphtheriebazillen, sind wir im Besitze derartiger Züchtungsmethoden.

Auch bei der Cholera asiatica kennen wir bereits eine Reihe von Faktoren, die zu den optimalen Lebens- und Züchtungsbedingungen des Erregers unentbehrlich sind. Das Studium dieser Einflüsse ist schon häufig Gegenstand der Forschung gewesen. Gehört doch die Cholera zu denjenigen Infektionskrankheiten, deren schnelle bakteriologische Diagnose eine ausserordentlich wichtige sanitätspolizeiliche Aufgabe ist.

Völligen Aufschluss besitzen wir über das Temperaturoptimum der Choleravibrionen; dieses liegt zwischen 30° bis 40° C. Bei Temperaturen unter 16° C lässt sich, wie Koch zeigte, kein mit dem blossen Auge erkennbares Wachstum feststellen; aber selbst bis zu 8° C herab findet eine sehr langsame, mit dem Mikroskop nachweisbare Entwicklung noch statt. Bei Temperaturen von 22°—25° C, die für das Gelatinewachstum hauptsächlich

benutzt werden, tritt schon eine lebhaftere Entwicklung der Kulturen ein.

Ebenso ist die optimale Zusammensetzung des Nährsubstrates für die Cholerabazillen bekannt. Sie zeigen eine ganz ausserordentliche Vermehrungsfähigkeit in gewöhnlicher Bouillon oder in einer 1% Peptonlösung, welche mit 0,5 % Kochsalz versetzt ist. Einen ganz wesentlichen Einfluss übt aber ausserdem die Reaktion der Nährmaterialien aus. Die Nährmedien müssen, wenn das Wachstum der Choleravibrionen auf ihnen ein gutes und üppiges sein soll, einen bestimmten Alkalescenzgrad besitzen. Namentlich zur Erzielung von virulenten und gut beweglichen Individuen ist ein Alkalitätsoptimum unerlässlich. Am besten hat sich bei darauf gerichteten Untersuchungen ein Alkalizusatz (auf den Lakmusneutralpunkt bezogen) von 3,0 ccm einer 10 % Na OH-Lösung auf 100,0 ccm Agar bezw. Gelatine bewährt. Im allgemeinen kann man die Beobachtung machen, dass die Choleravibrionen gegen einen geringeren Alkalescenzgrad empfindlicher sind als gegen erhöhten Alkalizusatz (Hesse)[1]). Auf Nährböden mit neutraler oder gar leicht saurer Reaktion findet ein Wachstum der Cholerabazillen nicht mehr statt. Bei schwach alkalischer Reaktion ist das Wachstum erheblich verlangsamt und das Verflüssigungsvermögen gegenüber der Gelatine vermindert. Wie Kitasato[2]) nachwies, genügt bereits ein Säuregrad des Nährbodens von 0,07 % Salzsäure, um jede Entwicklung der Choleravibrionen zu verhindern.

In flüssigen Nährsubstraten mit optimalem Alkalitätsgrad zeigen die Kommabazillen das eigentümliche Ver-

[1]) Hesse, Ueber den Einfluss der Alkalescenz des Nährbodens auf das Wachstum der Bakterien. Zeitschrift für Hyg. u. Inf., Bd. 15, 183.

[2]) Kitasato, Ueber das Verhalten der Typhus- und Cholerabazillen zu säure- oder alkalihaltigen Nährböden. Zeitschrift für Hyg., Bd. 3, 1888, 407.

halten, dass sie sich schon nach ganz kurzer Zeit ihres Wachstums in grosser Menge an der Flüssigkeitsoberfläche ansammeln. Bereits 6—8 Stunden nach Aussaat selbst ganz vereinzelter Vibrionen in Bouillon oder Peptonwassser findet man auf der Oberfläche oft eine Reinkultur der typischen Kommabazillen vor.

Diese Eigenschaft der Cholerabazillen, so ausserordentlich schnell in flüssigen Nährmedien zu wachsen und sich an der Oberfläche anzusammeln, ist zu Anreicherungsverfahren benützt worden, deren Prinzip zuerst von M. Schottelius[1]) durch Verwendung von Bouillon in grossen Schalen für die Schnelldiagnose und Züchtung der Cholera aus den Dejektionen Choleraverdächtiger angegeben wurde. Auf demselben Prinzip beruht die von R. Koch[2]) vorgeschlagene Anreicherung durch Aussaat choleraverdächtigen Materials in Reagensgläser mit 1% Peptonlösung, ein Verfahren, das sich dann unter dem Namen der „Koch'schen Choleraanreicherungsmethode" überall in der Praxis eingebürgert hat.

Die Eigentümlichkeit der Kommabazillen, sich in flüssigen Nährböden besonders an der Oberfläche anzusammeln und sich dort „anzureichern", wurde von jeher auf ein lebhaftes Sauerstoffbedürfnis derselben bezogen.

Dass sie sich in der Tat einer Entziehung des Sauerstoffs gegenüber empfindlich erweisen, konnte Koch dadurch zeigen, dass er eine Stelle einer mit Cholerabazillen beschickten Gelatineplatte mit einem Deckglase bedeckte. Schon die geringe Absperrung des Sauerstoffs, die durch das aufgelegte Deckgläschen bewirkt wurde, bedingte, dass sich die Vibrionen unter dem Deckglase im Laufe der nächsten Tage so gut wie gar nicht ent-

---

[1]) M. Schottelius, Zum mikroskop. Nachweis von Cholerabazillen in Dejektionen. Deutsche med. Wochenschrift 1893, S. 737 ff.

[2]) R. Koch, Ueber den augenblicklichen Stand der bakteriolog. Choleradiagnose. Zeitschrift f. Hyg. u. Inf., Bd. 14, 1893, S. 319.

wickelten, während ausserhalb des Deckglasbezirkes dort, wo der Sauerstoff unbehindert hinzutreten konnte, eine üppige Kolonieenbildung stattfand. Diese Beobachtung wurde von Hesse[1]) weiter verfolgt und ferner durch gasanalytische Untersuchungen nachgewiesen, dass bei völligem Sauerstoffabschluss auch nicht eine Spur von Wachstum mehr stattfand. Aber schon bei Zuleitung minimalster Mengen freien Sauerstoffs begann eine rege Entwicklung der Vibrionen.

Seit jeher gelten daher die Choleravibrionen als Sauerstoff liebende Organismen. Unter die ausgesprochen obligat aeroben Bakterien darf man sie allerdings nicht rechnen, da sie — ebenso wie viele andere pathogene Arten — sich im inficierten Organismus unter Bedingungen als lebensfähig und pathogen erweisen, die einer gänzlichen oder fast völligen Abwesenheit von Sauerstoff entsprechen. Auch im Experiment zeigen sie ja bei einer teilweisen Sauerstoffentziehung ein allerdings nur kümmerliches Wachstum.

Bekannt ist also bis jetzt, dass die Choleravibrionen bei ungehindertem Zutritt des in der atmosphärischen Luft enthaltenen Sauerstoffs üppiger wuchern, als bei vermindertem Sauerstoffgehalt ihrer Umgebung. Noch nicht dagegen ist die Frage untersucht, ob der Sauerstoffgehalt der atmosphärischen Luft bereits die für Cholera günstigste Sauerstoffkonzentration besitzt, oder ob durch Erhöhung des Sauerstoffgehaltes ein besseres Gedeihen erzielt werden kann.

Auf Anregung von Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. M. Schottelius habe ich daher Versuche angestellt über das Sauerstoffoptimum der Choleravibrionen.

---

[1]) Hesse, Ueber die gasförmigen Stoffwechselprodukte beim Wachstum der Bakterien. Zeitschrift für Hyg., Bd. 15.

Eigene Versuche.

An einer Reihe von aeroben Mikroorganismen hat man nachgewiesen, dass für die einzelnen Arten ein Optimum des Sauerstoffgehaltes ihrer Umgebung besteht. Eine Methode, welche diese Tatsache demonstriert, ist von Engelmann[1]), eine andere von Beijerinck[2]) angegeben worden.

Engelmann brachte in die Mitte eines mit verschiedenen Bakterienarten inficierten hängenden Tropfens eine belichtete, chlorophyllhaltige Alge. Diese scheidet bekanntlich Sauerstoff aus: bewegliche Bakterien sammeln sich je nach ihrer Sauerstoffspannung in engeren oder weiteren konzentrischen Ringen um die Alge an.

Die Methode Beijerincks beruht darauf, dass sich in flüssigen Nährmedien die Bakterien verschiedener Sauerstoffavidität in verschiedenen Schichten ansammeln und so regelmässige, geometrische Figuren (Ringe oder „Bakterienniveaus") bilden, welche sich immer in die Zone der optimalen Sauerstoffspannung einstellen. Um dieselbe Erscheinung in mikroskopischen Präparaten demonstrieren zu können, traf Beijerinck die Versuchsanordnung, dass durch Einschieben eines Platindrahtes unter das Deckglas von einer Seite das Hinzutreten der Luft ermöglicht wurde. Es bildeten sich dann entsprechend der durch das verschieden abgestufte Sauerstoffbedürfnis der verschiedenen Arten bedingten Lagerung in verschiedener Entfernung von der Sauerstoffquelle

---

[1]) Engelmann, Botanische Zeitung, 1881, 441; 1882, 338; 1888, 696.

[2]) Beijerinck, Centralblatt f. Bakteriologie, I. Abt., Bd. 14, 837; 1893.

sogenannte „Atmungsfiguren“ teils aus konzentrisch ringförmigen, teils aus flachen Bakterienansammlungen.

Diese Methoden ermöglichen zwar eine vorzügliche Illustration der Erscheinung, dass die verschiedenen Bakterien auf eine verschiedene Sauerstoffspannung abgestimmt sind; eine quantitative Feststellung dieses Optimums lässt sich hierbei aber nicht erzielen.

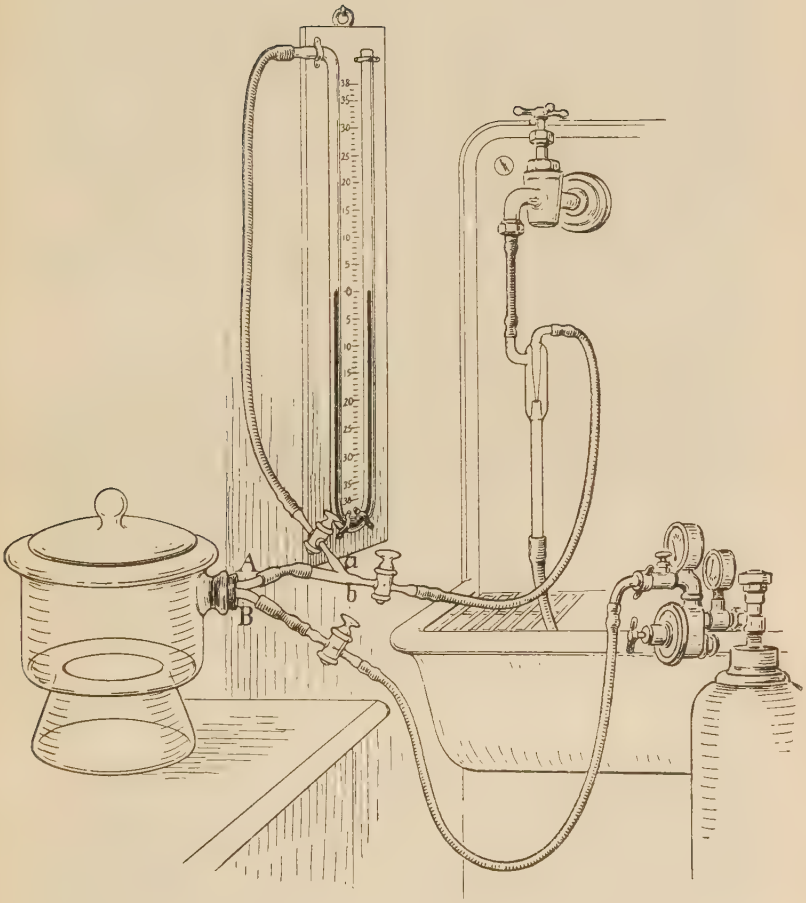
Bei der Frage nach dem Sauerstoffoptimum der Choleravibrionen kam es uns aber gerade auf eine zahlenmässige Ermittelung desselben an.

Wir bedienten uns daher bei den darauf gerichteten Versuchen einer Methode anderer Art, über die Herr Privatdocent Dr. K. Süpfle, unter dessen Leitung ich meine experimentellen Untersuchungen ausführte, im Centralblatt für Bakteriologie, Bd. 53, Heft 4 kurz berichtet hat. Die Prinzipien dieser Methode verdanken wir Herrn Prof. Dr. J. Koenigsberger, dessen liebenswürdige Unterstützung für die vorliegenden Untersuchungen eine physikalisch einwandsfreie Versuchsanordnung ermöglichte.

Versuchsanordnung.

a. Physikalischer Teil.

Zur quantitativen Bestimmung des Sauerstoffoptimums der Choleravibrionen bediente ich mich eines gewöhnlichen, in Laboratorien gebräuchlichen Exsikkators, der vermittels eines aufgeschliffenen Deckels nach sorgfältiger Einreibung mit Dichtungsfett luftdicht verschlossen werden kann (siehe Abbildung!). An der Wand des Exsikkators befindet sich eine durch einen doppelt durchbohrten Gummistöpsel verschlossene Öffnung. Durch diesen Stöpsel sind zwei Glasröhren A und B geführt, die innerhalb des Exsikkators wenige Millimeter hinter


A
B
a
b

dem Gummiverschluss frei endigen. Die eine Glasröhre A ist durch einen kurzen Gummischlauch mit einem T-Rohr verbunden, dessen einer Schenkel a vermittels eines Druckschlauches zum Manometer führt, dessen anderer Schenkel b durch einen entsprechenden Schlauch an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wird. Beide Schenkel des T-Rohres sind durch eingeschliffene Glashähne verschliessbar. Das zweite, durch den Gummistöpsel des Exsikkators geleitete Glasrohr B, welches ebenfalls durch einen Glashahn verschlossen werden kann, ist zur Einleitung des Sauerstoffs bestimmt.

Als Manometer diente uns ein gewöhnliches U-förmig gebogenes, mit einer Millimetermasseinteilung versehenes Quecksilbermanometer.

Den Sauerstoff liessen wir durch ein Schraubenventil dem oberen Ende einer senkrecht stehenden eisernen Sauerstoffbombe entströmen. Dieser Behälter trägt zunächst ein als Finimeter bezeichnetes Manometer, welches den Druck anzeigt, unter dem der Sauerstoff im Cylinder steht, bezw. denselben verlässt. Vor diesem Apparat ist ein Reduktionsventil eingeschaltet, das durch einen Hahn während der Exsikkatorfüllung stets auf 4 eingestellt gehalten wurde, d. h. es sollten in der Minute immer nur 4 Liter Sauerstoff ausströmen.

Die Anstellung des Versuches gestaltete sich folgendermassen:

Der mit Cholera beimpfte Nährboden, welcher sich in einer grossen offenen Schale befand, wurde in den Exsikkator gebracht und dieser vermittels des aufgeschliffenen, eingefetteten Deckels luftdicht verschlossen. Während die Lüftungshähne an den Glasröhren B und b abgedreht blieben, stand das zum Manometer führende Rohr a offen. Nun liess ich die Wasserstrahlpumpe in Funktion treten, öffnete den Hahn in b und evakuierte so den Exsikkator. Sobald die Manometerquecksilbersäule den gewünschten

Stand erreicht hatte, schloss ich den Hahn in b und stellte die Luftpumpe ab.

Hierauf wurde die Höhe des durch die Evakuierung erreichten Manometerstandes abgelesen, notiert und gleichzeitig der Barometerstand festgestellt.

Die aus dem Exsikkator nur teilweise evakuierte atmosphärische Luft ersetzte ich nun durch reinen Sauerstoff. Kopf- und Reduktionsventil des den Sauerstoff enthaltenden Cylinders wurden nur soweit geöffnet, dass der Sauerstoff mit einer Geschwindigkeit von 4 Litern in der Minute ausströmte; der zuerst austretende Sauerstoff blieb unbenutzt, damit der an dem Ausflussrohr der Bombe angebrachte Gummischlauch sich völlig mit reinem Sauerstoffgas füllen konnte.

Jetzt verband ich den Schlauch der Sauerstoffbombe mit dem Glasrohre B und öffnete dessen Verschlusshahn. Gleichzeitig kontrollierte ich das Manometer; sobald wieder der Druck der atmosphärischen Luft hergestellt war, wurde der Lüftungshahn in B zugedreht und die Ventile des Sauerstoffbehälters geschlossen. Darauf stellte ich den Manometerstand fest und notierte einen etwaigen kleinen Über- oder Unterdruck. Schliesslich wurde noch der Hahn des zum Manometer führenden Glasschenkels a gesperrt, so dass der Exsikkator nunmehr bei freier Transportabilität völlig luftdicht verschlossen war und somit eventuell in den Brutschrank gestellt werden konnte.

Nach gewünschter Stundenzahl brach ich den Versuch ab, entfernte den Deckel des Exsikkators und stellte das Resultat des Bakterienwachstums in geeigneter Weise fest (siehe später).

„Die Ermittelung des Sauerstoffgehaltes aus dem Luft-Sauerstoffgemisch innerhalb des Exsikkators erfolgt bei dieser Versuchsanordnung nicht durch Messung des einströmenden Sauerstoffgases, sondern durch Berechnung des Luftvolumens, welches sich nach einer bestimmten

Erniedrigung des Druckes noch in dem Exsikkator befindet.

Nach dem Boyle-Mariotte'schen Gesetze ist in unserem Falle das Produkt aus dem Volumen der Luft beim Evakuieren und dem Druck beim Evakuieren gleich dem Produkt aus Volumen und Druck nach der Sauerstoffeinführung. Daher ist, da die Masse der Luft bei der Einführung des Sauerstoffgases nicht entweicht und die Temperatur konstant bleibt,

$$v \cdot p = v_o \cdot p_o .$$

In dieser Formel berechnet sich der Druck p aus der Differenz des Barometerstandes b und der Höhe h des durch die Evakuierung erreichten Standes der Manometerquecksilbersäule. In analoger Weise ergibt sich der Druck p_o aus der Differenz bezw. der Summe des Barometerstandes b und der Höhe h_o des nach Einleitung des Sauerstoffes erhaltenen Standes der Quecksilbersäule.

Bekannt ist also p und p_o; das Volumen v sei der Einfachheit der Rechnung halber mit 1 angesetzt. Es verbleibt somit als unbekannt das Volumen der Luft $v_o = x$.

Demnach gestaltet sich die Berechnung von v_o folgendermassen:

$$1 \cdot (b - h) = (b \pm h_o) \cdot x ,$$

$$x = \frac{b - h}{b \pm h_o} .$$

Der für das Luftvolumen x gefundene Wert bezeichnet die Grösse des Volumens, das die ursprünglich vorhanden gewesene, durch die Evakuierung zum Teil entfernte atmosphärische Luft nach der Einführung des reinen Sauerstoffgases noch einnimmt. Diese Residualmenge atmosphärischer Luft besteht nicht ausschliesslich aus Sauerstoff; der für x gefundene Wert muss daher mit 0,79

(d. i. der Stickstoffgehalt der atmosphärischen Luft auf 1 bezogen) multipliziert werden: dieses Produkt gibt dann den Stickstoffgehalt des Luft-Sauerstoffgemisches an.

Die Subtraktion des so ermittelten Stickstoffgehaltes von 1 (dem für das Volumen der Luft v angenommenen Werte) liefert den gesuchten Sauerstoffgehalt in dem Luft-Sauerstoffgemisch des Exsikkators in Volumprozenten.

Für das Bakterienwachstum ist aber nicht nur der Sauerstoffgehalt der umgebenden Luft, sondern auch die Menge des in dem betreffenden Nährboden adsorbierten Sauerstoffes von Bedeutung. Da die adsorbierte Menge Sauerstoff dem Partialdruck desselben proportional ist, besitzt für die Beurteilung des Sauerstoffeinflusses die Bestimmung des Partialdruckes grosses Interesse.

Durch Multiplikation des ermittelten Sauerstoffgehaltes in Volumprozenten (auf 1 bezogen) mit dem Druck p_o resultiert die Partialspannung des Sauerstoffs in Millimetern Quecksilbersäule."

b) Bakteriologischer Teil.

Als Nährboden benutzte ich bei meinen Versuchen Bouillon, Agar und Gelatine in der üblichen Zusammensetzung, wobei die Reaktion stets ausgesprochen alkalisch (Lakmuspapier) gewählt wurde.

Die mir zur Verfügung stehende Cholerakultur entstammte der vorjährigen Choleraepidemie in Russland und war von einem Cholerafall in Moskau isoliert worden. Mit diesem im Hygienischen Institut zu Freiburg i. Br. als „Cholera Moskau 1908" geführten Stamm sind sämtliche Versuche angestellt worden.

Als Ausgangsmaterial diente jeweils eine auf frisch schräg erstarrtem Agar bei Brutschranktemperatur gezüchtete 12—16stündige Kultur. Diese Zeit wurde deshalb gewählt, weil nach Untersuchungen von Gotschlich

und Weigang[1]) die Zahl der lebensfähigen Vibrionen mit dem Alter der Kulturen abnimmt: nach 18 Stunden sinkt die Zahl der entwicklungsfähigen Keime sehr schnell, so dass z. B. in einer zwei Tage bei 37° C gezüchteten Kultur nur noch 10% derjenigen Choleravibrionen lebend sind, die in der 12—16 stündigen Kultur entwicklungsfähig vorhanden waren.

In Vorversuchen wurden mit dem Ausgangsmaterial oberflächliche parallele Striche auf erstarrten Agarplatten angelegt; die zur Anfertigung der Strichimpfung benutzte Platinöse war jedesmal nach Möglichkeit mit der gleichen Menge Kulturmasse gefüllt. Die Grösse und Üppigkeit des Wachstums dieser Impfstriche gab im Vergleich zu Kontrollplatten, die bei atmosphärischer Luft gehalten worden waren, einen orientierenden Anhaltspunkt über den Einfluss des gewählten Sauerstoffpartialdruckes.

Nachdem sich so hatte nachweisen lassen, dass überhaupt bei Erhöhung des Sauerstoffgehaltes ein besseres Wachstum der Choleravibrionen eintritt, liess sich durch solche Vorversuche auch die ungefähre Grösse des Sauerstoffbedarfes ermitteln.

Quantitative Versuche sollten nun die Grenzen des Sauerstoffoptimums möglichst genau feststellen. Zu diesem Zweck wurde die Wachstumsintensität der Choleravibrionen nicht mehr allein nach dem makroskopischen Aussehen, sondern lediglich nach der Zahl der lebensfähigen Keime beurteilt.

Bei diesen Versuchen geschah die Züchtung der Kommabazillen in Bouillon. Grössere Petrischalen von 9 cm Durchmesser lichter Weite und 2,5 cm Höhe waren mit 50,0 ccm Bouillon angefüllt. Die Schalen mit Bouillon

[1]) Gotschlich und Weigang, Ueber die Beziehungen zwischen Virulenz und Individuenzahl einer Cholerakultur. Zeitschrift für Hygiene und Inf., Bd. 20, S. 380.

wurden jeweils mit der gleichen, abgemessenen Menge Kultur beimpft, und zwar mit 0,5 ccm eines Bouillonröhrchens von 5,0 ccm Inhalt, in dem zwei Ösen einer 12—16 stündigen Agarkultur verrieben waren.

Die Schalen kamen dann sofort unter die zu prüfende Sauerstoffspannung; eine oder mehrere Kontrollschalen blieben unter der Einwirkung der atmosphärischen Luft.

Die beimpften Bouillonschalen hielten wir meist bei Zimmertemperatur, die — zur Zeit der Versuche bestand gleichmässige Zimmertemperatur — 21,5° bis 22,0° C betrug.

Zwischen 6—24 Stunden schwankte die Dauer der Versuche.

Nach Beendigung eines jeden Versuches wurde die Keimzahl in sämtlichen Schalen durch das Gelatineplattenverfahren ermittelt. Durch Abpipettieren von 1,0 ccm der zu untersuchenden Bouillon — die Entnahme erfolgte stets von den oberflächlichsten Schichten — und Vermischen mit 9,0 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung erzielten wir zunächst eine Verdünnung von 1 : 10, die dann in analoger Weise bis auf 1 : 1 000 000, nötigenfalls bis auf 1 : 100 000 000 fortgesetzt wurde. Von der Verdünnung 1 : 1 000 bezw. 1 : 100 000 an wurden Gelatineplatten mit 1,0 ccm, 0,5 ccm und 0,1 ccm der einzelnen Verdünnungen angelegt.

Nach Ablauf von 3 . 24 Stunden stellte ich die Anzahl der gewachsenen Kolonieen fest. Zum Auszählen dienten nur diejenigen Platten, die nicht mehr Kolonieen enthielten, als mit unbewaffnetem Auge leicht gezählt werden konnten. Nur solche Versuche wurden als einwandfrei und beweiskräftig angesehen, bei denen die Keimzahl in den einzelnen Verdünnungsserien — unter Berücksichtigung geringer, bei so hohen Verdünnungen unvermeidlicher Schwankungen — innerhalb der gegebenen Fehlergrenzen die entsprechende Grösse aufwies.

Ergebnis der Versuche.

Die ersten Vorversuche hatten lediglich den Zweck, mit Hilfe der beschriebenen Versuchsanordnung einen orientierenden Überblick über das Sauerstoffbedürfnis der Choleravibrionen überhaupt zu gewinnen.

So liess sich zunächst einerseits feststellen, dass eine Verminderung des Sauerstoffes unter den Partialdruck der atmosphärischen Luft deutlich ein schlechteres Wachstum der Kommabazillen zur Folge hatte. Und zwar war die Wachstumshemmung deutlich abhängig von der Höhe der Sauerstoffentziehung. Bei einem Sauerstoffpartialdruck von 35 mm beispielsweise war die Vermehrungsintensität gegenüber gleichzeitigen Kontrolluntersuchungen bei atmosphärischer Luft (= 156 mm Sauerstoffpartialdruck) nur noch sehr spärlich. Die geringere Sauerstoffspannung wurde hierbei entweder durch Evakuieren der atmosphärischen Luft oder durch Evakuieren und nachfolgenden Ersatz durch Wasserstoff erzeugt.

Anderseits ergab sich, dass in reinem Sauerstoff zwar ein Wachstum der Choleravibrionen statthat, aber ebenfalls dürftiger ausfällt als bei Einwirkung der atmosphärischen Luft. Die Züchtung in reinem Sauerstoff geschah hierbei so, dass der Exsikkator soweit wie möglich evakuiert und die entfernte atmosphärische Luft durch Sauerstoff ersetzt wurde; hierauf erfolgte eine abermalige Evakuierung und nachfolgende Einleitung von Sauerstoff; war diese Prozedur zum dritten Male wiederholt worden, so hatte man eine reine Sauerstoffatmosphäre in dem Exsikkator.

Nunmehr wurden nach der ausführlich beschriebenen Versuchsanordnung Sauerstoff-Luftgemische hergestellt, in denen die Züchtung erfolgte. In grösseren Abstufungen kamen Gemische von 21 Volumprozenten Sauerstoff

der atmosphärischen Luft bis 70 Volumprozent Sauerstoff in Anwendung.

Hierbei zeigte sich, dass z. B. bei einem Sauerstoff-Luftgemisch von 56 Volumprozenten Sauerstoff (= 423 mm Partialdruck) das Wachstum der Vibrionen noch bedeutend spärlicher war, als bei Züchtung in gewöhnlicher atmosphärischer Luft. Bei 35 Volumprozenten Sauerstoff (= 260 mm Partialdruck) fand dagegen zweifellos eine üppigere Entwicklung der Kulturen statt, als bei atmosphärischer Luft.

Damit war festgestellt, dass ein höherer Sauerstoffgehalt als derjenige der Luft den Cholerabazillen zusagte. Zwischen dem zuletzt gefundenen Wert von 35 Volumprozenten und der Partialspannung der atmosphärischen Luft musste also das Optimum zu suchen sein.

Durch genaue Bestimmung der Keimzahl liess sich die Grenze dieses Optimums immer weiter einschränken. Bei einer grossen Anzahl derartiger Versuche ergab sich als Mittelzahl für das Sauerstoffoptimum 26,5 Volumprozent Sauerstoff = 198 mm Sauerstoffpartialdruck.

Das Sauerstoffoptimum liegt also nahe bei dem Sauerstoffgehalt der atmosphärischen Luft, übertrifft diesen aber um eine durchaus gut messbare Zahl. Das bisher stets vermutete, grosse Sauerstoffbedürfnis der Choleravibrionen erscheint danach als eine experimentell nachweisbare Tatsache.

Von den zahlreichen Versuchen seien zur Illustration der Einwirkung der verschiedenen Sauerstoffspannung nur zwei Versuchsreihen als Typen wiedergegeben. Die übrigen Versuche fielen entsprechend aus; bald war der Einfluss auf die Höhe der Keimzahl noch ausgesprochener, bald etwas weniger eklatant. Immer aber blieb die Einwirkung des höheren Sauerstoffgehaltes unverkennbar und immer ergab sich die nämliche Sauerstoffkonzentration als Optimum des Sauerstoffbedürfnisses.

Versuchsprotokoll A

vom 9. August 1909.

Barometerstand: 744 mm,
Temperatur: 21,0° C,
Dauer des Versuches: 18 Stunden.

Nummer der Versuchsschale:	Evakuierung bis auf mm:	Darauf Sauerstoffzufuhr bis auf mm:	Volumprozent Sauerstoff:	Partialdruck des Sauerstoffs in mm Quecksilber:	Verdünnung der im Versuche gewachsenen Bouillonkultur:	Keime in ccm der Verdünnung: 1,0	0,5	0,1	Durchschnittliche Keimzahl in 1 ccm:
I	Kontrolle		21	156	1:1 000 000	54	24	5	50 000 000
II	714	744	24,1	179	1:1 000 000	98	63	12	114 000 000
III	706	746	25,7	191	1:1 000 000	594	266	39	505 000 000
IV	698	750	26,5	198	1:1 000 000	∞	∞	200	
					1:10 000 000	150	93	25	1 950 000 000

Versuchsprotokoll B

vom 13. August 1909.

Barometerstand: 745 mm,
Temperatur: 21,5° C,
Dauer des Versuches: 12 Stunden.

Nummer der Versuchsschale:	Evakuierung bis auf mm:	Darauf Sauerstoffzufuhr bis auf mm	Volumprozent Sauerstoff:	Partialdruck des Sauerstoffs in mm Quecksilber:	Verdünnung der im Versuche gewachsenen Bouillonkultur:	Keime in ccm der Verdünnung: 1,0	0,5	0,1	Durchschnittliche Keimzahl in 1 ccm:
I	Kontrolle		21	156	1:10 000 000	24	9	2	
					1:100 000 000	2	1	—	205 000 000
II	709	746	25	186	1:10 000 000	85	46	9	
					1:100 000 000	7	4	1	845 000 000
III	699	750	26,5	198,8	1:10 000 000	131	50	12	
					1:100 000 000	9	4	1	1 030 000 000
IV	689	746	27,3	202,6	1:10 000 000	47	28	4	
					1:100 000 000	8	2	—	520 000 000

Der Nachweis, dass für die Choleravibrionen ein Sauerstoffoptimum existiert, ist nicht nur theoretisch interessant, sondern verspricht auch praktische Verwertbarkeit. Die sanitätspolizeiliche Wichtigkeit einer möglichst schnellen bakteriologischen Choleradiagnose wurde bereits eingangs betont. Es ist zu hoffen, dass die Berücksichtigung der Sauerstoffavidität der Choleravibrionen den bakteriologischen Choleranachweis erleichtern wird.

Einige orientierende Versuche in dieser Richtung lassen diese Hoffnung als durchaus berechtigt erscheinen. Soweit sich aus den bisher angestellten Laboratoriumsexperimenten beurteilen lässt, gelingt es, durch Züchtung choleraverdächtigen Materiales unter einem Sauerstoffpartialdruck von ca. 198 mm Quecksilbersäule, die Choleravibrionen noch schneller und massenhafter „anzureichern“ als bei der bisher üblichen Methode der Kultivierung unter gewöhnlicher atmosphärischer Luft.

Zur endgültigen Entscheidung der praktischen Verwertbarkeit des Prinzips der Züchtung bei dem Sauerstoffoptimum ist es notwendig, die beschriebene Methode an Untersuchungsmaterialien der Praxis zu erproben.

Schlussfolgerungen:

Das Ergebnis meiner Untersuchungen fasse ich dahin zusammen:

1. Die Choleravibrionen besitzen ein ausgesprochenes Sauerstoffbedürfnis; sie bleiben zwar auch bei Anwesenheit nur minimaler Spuren von Sauerstoff lebens- und vermehrungsfähig, zeigen indessen ihre grösste Wachstumsintensität bei ungehindertem Zutritt des atmosphärischen Luftsauerstoffes.
2. Ebenso, wie es ein Temperatur- und ein Alkalitätsoptimum gibt, existiert für die Cholerabazillen auch ein Sauerstoffoptimum.
3. Das Sauerstoffoptimum für die Choleravibrionen liegt bei einer Sauerstoffkonzentration, die höher ist als der Sauerstoffgehalt der Luft, nämlich bei 26,5 Volumprozenten Sauerstoff = 198 mm Sauerstoffpartialdruck.

Bevor ich schliesse, sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geh. Hofrat Prof. Dr. Schottelius für die Anregung zu dieser Arbeit und das ihr entgegengebrachte Interesse ehrerbietigst zu danken. Ebenso bin ich Herrn Privatdozenten Dr. Süpfle für seine mir jederzeit freundlichst erteilten Ratschläge zu Dank verpflichtet.